D13S25/D13S1009 DNA-FISH Probe

Sonde d'énumération, bicolore

REF 14-009

IVD CE

-20°C



Mode d'emploi

Usage prévu

La sonde DNA-FISH D13S25/D13S1009 de Cancer Genetics Italia est concue pour détecter la perte du gène D13S25 sur le chromosome 13q14 par rapport au marqueur témoin D13S1009 sur le chromosome 13q34 par hybridization *in situ* en fluorescence (FISH/Fluorescence *in situ* hybridization). La perte de D13S25, un locus distal du gène *RB1*, a été détecté dans 65% des cas des leucémies chroniques à cellules B lymphocytaire (LLC-B),[1] dans 30-50% du myélome multiple (MM) as,[2,3] rarement dans une variété de lymphome non hodgkinien de (LNH)[4] et dans plusieurs pathologies myéloïdes.[5] La perte de 13q14 a une forte valeur pronostique en corrélation avec la progression lente de la maladie et un meilleur pronostic chez les patients LLC-B[5] alors qu'elle est associée à un stade supérieur de la maladie et une survie plus courte chez les patients avec un myeloma multiple.

D13S25 (13q14) 13q centromère D13S25 D13S1009 télomère ~186kb ~321kb D13S1009 (13q34) 13

Représentation schématique de la sonde DNA-FISH D13S25/D13S1009: Les barres horizontales rouges et vertes indiquent les zones couvertes par les sondes (approximativement à l'échelle, NCBI 36.1/HG18/2006). La sonde D13S25 (rouge) étiquetée directement couvre la totalité du locus. La sonde D13S1009 (verte) étiquetée directement couvre le locus et sert de témoin.

Conservation

À l'arrivée, conserver le produit à - 20°C, à l'abri de la lumière, jusqu'à la date de péremption.

Conservation des lames : Conserver les lames hybridées a -20°C, à l'abri de la lumière.

Remarque: Ces conditions de conservation s'appliquent à la fois aux produits non ouverts et ouverts. Le nombre de cycles de gel-dégel ne doit pas dépasser le nombre de tests recommandés par flacon. Conserver dans le flacon d'origine. Les flacons conservés dans d'autres conditions peuvent ne pas offrir de performance optimale et par conséquent affecter les résultats du test.

Manipulation

» Tous les réactifs doivent être manipulés comme s'ils étaient capables de transmettre des agents infectieux. Après usage, tout le matériel doit être éliminé conformément à la loi nationale en vigueur.

» Manipuler tous les réactifs et lames contenant des fluorophores en éclairage réduit, afin d'éviter toute détérioration du signal fluorescent.

Avertissements et mises en garde

Lire le mode d'emploi avant toute utilisation.

» Tout transport ou conservation impropre peut détruire ou détériorer la performance du produit.

» En cas de réception d'emballage ou de flacon endommagé, de défaillance du dispositif (après utilisation conforme au mode d'emploi) ou de blessure de l'utilisateur, contacter le fabricant.

» Tout flacon endommagé doit être éliminé conformément à la loi nationale en vigueur et aucun essai ne doit être réalisé à partir d'un tel réactif.

» Manipuler tous les réactifs avec soin et porter un équipement de protection individuelle approprié.

» Le formamide, la solution saline de citrate de sodium (SSC/Saline-Sodium Citrate) et le dodécyl sulfate de sodium (SDS) peuvent avoir des effets tératogènes et mutagènes : éviter toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau.

» Le DAPI est un irritant. Consulter le Material Safety Data Sheet (MSDS) du produit pour les informations concernant la sécurité.

Réactif fourni

Sonde DNA-FISH prête à l'emploi : 100 µL par flacon (10 tests). Un test est défini comme suffisant pour une aire de 22mm x 22mm.

Sonde étiquetée au fluorophore pour le locus D13S25 (rouge) et au fluorophore pour le locus D13S1009 (vert), prémélangée avec de l'ADN bloquant et un tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC et SDS).

Réactifs et matériel nécessaire mais non fournis

Equipements		Reactifs
Bocal coplin	Microcentrifugeuse	Étanol à 100%
Lamelles couvre-objets (22x22 e 25x25)	Microtube à centrifuger (0,5 mL)	PBS 10X
		HCl 1N
Microscope à épifluorescence	Micropipettes (1 à 200 mL)	$MgCl_2$ 1M
	pH-mètre	NaOH 1M
Pinces	Colle de caoutchouc	SSC 20X
Hotte aspirante	Plateau pour lames	Formaline à 10%
Gants	Thermomètre, calibré (37°C to 80°C)	DAPI et Antifade
Chambre humidifiée		Eau distillée
Huile d'immersion	Plaque chauffante	Pepsine
Incubateur	Bain-marie	Tween 20
Lampe à mercure (100 watts)		

Préparation des réactifs

Remarque: Utiliser de l'eau distillée pour la préparation de toutes les solutions-mères et de toutes les solutions de travail.

Série d'éthanol (70%, 85% et 100%): Préparer des dilutions vol/vol d'éthanol à 100% et d'eau distillée. Conserver à TA.

HCl 0,01N (acide chlorhydrique): Ajouter 0,5 mL de HCl 1N à 49,5 mL d'eau distillée. Conserver à TA. Préchauffer la solution à 37°C dans un bain-marie avant usage.

Solution-mère de pepsine à 0.4% (4 mg/mL): Dissoudre 100 mg de pepsine dans 25 mL de HCL 0.2N. Conserver des aliquots de 500 µL à - 20°C.

Formaldéhyde à 1%: Ajouter 12,5 mL de formaline à 10% (4% formaldehye) à 37 mL de PBS 1X. Ajouter 500 µL de $MgCl_2$ 100X. Conserver à 4°C jusqu'à une semaine.

SSC 0,5X(Citrate de sodium salin)/Tween 20 à 0,1%: Ajouter 25 mL de SSC 20X et 1 mL de Tween 20 à 974 mL d'eau distillée. Bien mélanger en tournoyant. Conserver à TA.

PBS 1X (solution saline dans un tampon phosphate): Mélanger 100 mL de PBS 10X et 900 mL d'eau distillée. Ajuster le pH à 7,0. Conserver à TA.

SSC 2X: Mélanger 100 mL de SSC 20X et 900 mL d'eau distillée. Ajuster le pH à 7,0. Conserver à température ambiante (TA).

SSC 2X/Tween 20 à 0,1%: Ajouter 100 mL de SSC 20X et 1 mL de Tween 20 à 899 mL d'eau distillée. Bien mélanger en tournoyant. Conserver à TA.

$MgCl_2$ 100X (Chlorure de magnesium) dans PBS 1X: Ajouter 50 µL de MgCl2 1M a 450 µL de PBS 1X.

Procédure Standard for FISH

Remarque: Produit prêt à l'emploi. Ne pas reconstituer ni diluer. Pour usage professionnel uniquement.

» Seul(e) un(e) technologiste médical(e) familiarisé(e) avec les méthodes de cytogénétique et formé(e) à la technique FISH peut réaliser le test. Tout l'équipement doit être étalonné avant la réalisation du test.

» Le tissu visé est du sang périphérique et la moelle osseuse. Les lames doivent être préparées conformément aux directives des méthodes cytogénétiques standards du laboratoire réalisant le test.

Préparation des lames

Toutes les lames fraîchement préparées doivent être vieillies pendant 1 heure et demie à 45 -50°C avant l'hybridation. Si l'hybridation n'a pas lieu le même jour que la préparation, conserver les lames à 4°C ou à - 20°C. Les lames avec des cellules à cytoplasme visible peuvent nécessiter un prétraitement à l'aide d'un enzyme protéolytique du type pepsine (voir prétraitement facultatif à la pepsine).

Prétraitement facultatif des lames à la pepsine

1. Préchauffer 50 mL de HCl 0,01N à 37°C.
2. Ajouter 10 à 15 µL de solution-mère de pepsine à 0.4% aux 50 mL de HCl 0,01N préchauffés et incuber la lame pendant 5 à 10 min à 37°C dans la pepsine.

   Remarque sur la procédure: Certains spécimens peuvent nécessiter des temps de digestion plus longs dans la pepsine.
3. Laver deux fois la lame pendant 5 min dans une solution PBS 1X à température ambiante (TA).
4. Incuber la lame pendant 5 min dans du formaldéhyde à 1% à TA.
5. Laver la lame pendant 5 min dans une solution PBS 1X à TA.
6. Déshydrater la lame dans de l'éthanol à 70%, 85% et 100% à TA pendant 1 min chacun.
7. Laisser sécher la lame à l'air libre.

   Remarque sur la procédure: Vérifier la morphologie de l'échantillon à l'aide d'un microscope à contraste de phase avant l'hybridation. Ne pas hybrider en cas de compromission de la morphologie nucléaire.



(*Suite à la page suirante*)

Procédure Standard for FISH

Dénaturation/hybridation de la sonde DNA-FISH

1. Vortexer brièvement la sonde DNA-FISH et centrifuger le tube dans une microcentrifugeuse pendant 30 secondes.
2. Appliquer 10 µL de sonde DNA-FISH sur la zone cible sur la lame et la recouvrir d'une lamelle couvre-objet (22 x 22 mm).
   Remarque sur la procédure: Prendre soin d'éviter toute formation de bulles d'air. Des lamelles couvre-objets plus petites ou plus grandes peuvent être utilisées en fonction du changement proportionnel de volume de la sonde DNA-FISH.
3. Sceller soigneusement les bords de la lamelle couvre-objet à l'aide de colle de caoutchouc.
4. Co-dénaturer la lame et la sonde DNA-FISH pendant 3 min à 80°C sur une plaque chauffante à température controlée.
5. Incuber pendant 12 à 18 heures dans une chambre humidifiée à 37°C, à l'abri de toute lumière directe.

Lavage post-hybridation

Remarque sur la procédure: Eviter de faire sécher la lame avant que le lavage soit fini.

1. Préchauffer les solutions de SSC 2X/Tween 20 à 0,1% et de SSC 0,5X/Tween 20 à 0,1% à 45°C.
2. Retirer la colle de caoutchouc de la lame à l'aide de pinces.
3. Tremper brièvement la lame dans la solution de SSC 2X à TA. Retirer la lamelle couvre-objet.
4. Laver la lame pendant 2 x 5 min dans une solution de SSC 2X/Tween 20 à 0,1% à 45°C.
5. Laver la lame pendant 2 x 5 min dans une solution de SSC 0,5X/Tween 20 à 0,1% à 45°C.
6. Rincer brièvement la lame dans de l'eau distillée.
7. Laisser sécher la lame à l'air libre à l'abri de la lumière directe.
8. Appliquer 20 µL de DAPI/Antifade à la zone hybridée et recouvrir d'une lamelle couvre-objet (25 x 25 mm).

Accessoires pour microscope

» Objectifs

Un objectif 10X est adapté au balayage de la zone cible. Un grossissement supérieur s'avère nécessaire pour l'analyse des signaux et doit avoir lieu avec un objectif à immersion à huile 63X ou 100X.

» Huile d'immersion

L'huile d'immersion doit être adaptée à la microscopie en fluorescence.

» Lampe

Une lampe à mercure de 100 watts avec une durée de vie maximale de 200 heures est recommandée. Remplacer la lampe avant qu'elle ne dépasse les 200 heures.

» Filtres recommandés

Fluorophore	Excitation $_{max}$	Émission $_{max}$
Verte	496 nm	520 nm
Rouge	580 nm	603 nm
DAPI	360 nm	460 nm

Visualisation et interprétation des signaux

Le signal doit être visualisé à l'aide d'un microscope à épifluorescence équipé des filtres appropriés.

Remarque sur la procédure: Les signaux peuvent être à différents plans focaux, c'est pourquoi il est important de focaliser vers le haut et vers le bas des spécimens, afin de s'assurer du comptage de tous les signaux.

» Dans la métaphase diploïde normale et dans les noyaux en interphase, la sonde DNAFISH D13S25/D13S1009 génère deux signaux rouges et deux verts correspondant aux deux chromosomes 13 normaux.

» Dans les cellules avec délétion de la totalité d'un chromosome 13, le nombre de signaux rouges (D13S25) et verts (D13S1009) sera réduit.

» Dans les cellules avec délétion interstitielle du chromosome 13, dans lesquelles le locus D13S25 est délété et le locus D13S1009 conservé, on observera un signal rouge (D13S25) et deux signaux verts (D13S1009).

Recommandations et limitations

» Ce produit a été optimisé pour être utilisé sur des lames préparées à partir de spécimens de sang périphérique, et de moelle osseuse conformément aux méthodes cytogénétiques courantes. Le fabricant garantit que ce produit répond aux caractéristiques de performance analytique (sensibilité, spécificité, reproductibilité et intervalle de validité) établies sur du sang périphérique normal ou des tissus prévus.

» Chaque nouveau lot de sonde DNA-FISH doit être testé pour la spécificité du locus sur un spécimen de sang périphérique normal et sur le tissu prévu, pour vérifier la bonne performance du réactif. Il incombe au laboratoire d'établir les intervalles de validité à l'aide de spécimens de controle positifs et négatifs du tissu prévu.

» L'utilisation de filtres aux caractéristiques spectrales autres que celles spécifiées peut affecter négativement la force du signal. Par exemple, le fluorophore rouge est visible à travers un filtre orange, mais les signaux apparaissent faibles.

» La technique FISH sur métaphase est recommandée pour caractériser les variantes et les patrons de signaux anormaux atypiques.

» Le test FISH est considéré comme une adjonction à la cytogénétique classique (caryotype). Les résultats de ces tests doivent être interprétés dans la totalité du contexte des antécédents cliniques du patient. Aucune décision médicale ne peut être prise en se fondant uniquement sur les résultats du test FISH.

Glossaire des symboles

- LOT Numéro de lot
- Risques biologiques
- REF Numéro de catalogue
- Attention, consulter la documentation d'accompagnement
- CE Marquage CE de conformité
- Contient suffisamment pour 10 tests
- IVD Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
- Conserver à l'abri de la lumière du soleil
- Fabricant
- Limite supérieure de température
- Utiliser avant le



Cancer Genetics Italia S.r.l.
Viale Luigi Majno, 17
20122 Milano - Italia
www.cancergeneticsitalia.com
support@cancergeneticsitalia.com

DNA-FISH Probe fabriquée dans la communanté européenne par Cancer Genetics Italia S.r.l.

Bibliographie

1. Nelson, B. P., et al. Am J Clin Pathol, 2007. 128(2):323-32.
2. Chen, L., et al. Exp Oncol, 2007. 29(2):116-20.
3. Terpos, E., et al. Leuk Lymphoma (Review), 2006. 47(5):803-14.
4. Dierlamm, J., et al. Cancer Genet Cytogenet, 2000.120(1):1-5.
5. Ma, E. S. K., et al. www.AtlasGeneticsOncology.org.
6. Reddy, K. S. Br J Haematol, 2006. 132(6):705-22.

Version: 05.17.12